

● 论 著 ●

解毒通络保肾法抑制糖尿病肾病炎症发病机制的研究 *

朴春丽¹ 杨叔禹² 仝小林³

(1 长春中医药大学附属医院 吉林长春 130021; 2 福建省厦门市第一医院博士后工作站 厦门 361000;

3 中国中医科学院广安门医院 北京 100053)

摘要:目的:研究中药解毒通络保肾胶囊对糖尿病(DM)大鼠肾脏病变的保护作用及其机制。方法:将实验动物分为正常对照组、DM 组、解毒通络保肾胶囊中药实验组和苯那普利阳性对照组。检测各组第 12 周的血糖、尿素氮、血肌酐、尿白蛋白排泄率(UAER)、血脂、血管紧张素 II(Ang II)含量和肾脏肥大指标的变化,应用 RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA,免疫组化检测肾内纤维连接蛋白(FN)和 IV 型胶原(Col IV)蛋白、PCNA 蛋白、NF- κ Bp65 蛋白、MCP-1 蛋白、ED-1 蛋白表达水平。结果:中药实验组较 DM 组血糖水平显著降低($P<0.01$),UAER 明显减少($P<0.05$),尿素氮和血肌酐水平下降,肾脏肥大指标改善($P<0.01$);明显降低 Ang II 含量,PCNA、FN 和 Col IV 蛋白表达显著低于 DM 组($P<0.01$)。RT-PCR 结果表明,DM 大鼠肾皮质 MCP-1 mRNA 表达升高,中药实验组 MCP-1 mRNA 低于 DM 组($P<0.05$)。结论:解毒通络保肾胶囊对 DM 肾脏病变有保护作用,其机制可能是通过减少肾组织中 Ang II 含量,下调 DM 大鼠 NF- κ B,减少 MCP-1 表达,从而抑制肾内炎症的反应。

关键词:糖尿病;解毒通络保肾胶囊;肾内炎症;血管紧张素 II;核因子 κ B;单核细胞趋化蛋白 -1

Abstracts:Objective:To investigate the protective effects of JieDuTongLuoBaoShen Capsules (JC) against renal lesion in diabetic rats.Method:The experimental animals were divided into normal control group,diabetic control group,positive control group and experimental group.The level of the blood sugar,urea nitrogen blood creatinine,angiotensin II(AngII)were measured and the excretion rate(UAER) of urinary albumin and index of renal hypertrophy were detected in each group at the 12th week after the experiment.At the same time,RT-PCR was used to detect the mRNA expression of renal monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1),and immunohistochemical techniques were used to detect the expressions of renal fibronectin (FN),type IV collagen (Col IV),proliferating cell nuclear antigen (PCNA),nuclear factor Kappa B(NF- κ B),MCP-1,macrophage mark antigen(ED-1).Results:In the JC-treated group,the blood sugar level was markedly lowered ($P<0.01$),UAER was markedly reduced($P<0.05$),the levels of urea nitrogen and blood creatinine were decreased,and the renal hypertrophy index was improved ($P<0.01$),as compared with those in the diabetic control group.The RT-PCR detection showed that the mRNA expression of renal MCP-1 was increased ($P<0.05$),and the sediment of glomerular FN、Col IV、PCNA、NF- κ B、MCP-1 and ED-1 were lower than those in diabetic control group ($P<0.01$).Conclusion:The mechanism of the protective effects of JC against renal lesion may be decreasing the levels of AngII in the renal tissue,downregulating the level of NF- κ B,reducing the expression of MCP-1,and inhibiting the inflammatory pathogenesis of diabetic nephropathy.

Key words:diabetes;inflammatory pathogenesis of the kidney;JieDuTongLuoBaoShen Capsules;angiotensin II;nuclear factor- κ B;monocytechemoattractant protein-1

中图分类号:R 587.2

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2009)03-0001-05

糖尿病肾病(DN)是多因素综合作用的结果,脂代谢紊乱、肾脏血流动力学改变、多种细胞因子及遗传背景均起重要的作用。近年来,不少学者在探索 DM 和 DN 的病因时,提出了 DN 炎症发病学说,认为 DM、DN 是一种自然免疫和低度炎症性疾病^[1],炎症能引起 DN,并在 DN 进展的整个过程中起重要作用。肾小球细胞外基质(ECM)积聚、系膜细胞(MC)增生与 DN 密切相关,是许多肾小球病变发生机制中的重要环节和共同病理特征。研究显示 ECM 积聚与肾小球单核细胞浸润有关,其中血管紧张素 II(AngII)、核因子(NF- κ B)、单核细胞趋化蛋白 -1(MCP-1)等炎症因子所起的作用,尤为人们所瞩目^[2]。本研究拟从对肾小球单核巨噬细胞浸润、系膜细胞增生及 ECM 主要成分 IV 型胶原、FN 影响为切入点,研究其保护肾功能的分子机制,并探讨 MCP-1、NF- κ B、AngII 三者 DN 发生、发展中的内在联系,为解毒通络保肾胶囊通过抑制 DN 炎症发

病机制,发挥治疗效果提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验用药 链脲佐菌素(STZ)为美国 Sigma 公司产品;解毒通络保肾胶囊由吉林省中医院制剂室提供;血管紧张素 II(Ang II)放免测定盒购自北京北方生物技术研究所;兔抗鼠 IV 型胶原(Col IV)和纤维连接蛋白(FN)多克隆抗体(即用型)、兔抗大鼠 NF- κ Bp65、MCP-1、ED-1 的多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、HIGH SABC 试剂盒为武汉博士德公司产品;逆转录酶试剂盒由 Invitrogen 公司生产;Tag 酶为北京鼎国生物技术发展中心产品;DNA Marker(DL 2000)由 Takara 公司提供。

1.2 动物模型的建立与分组 将雄性 Wistar 大鼠按体重随机分为两组,即正常对照组 10 只,DM 模型制作组 50 只。模型制作组单次腹腔注射 STZ 52 mg/kg (临用前用 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液溶解,pH

* 基金项目:国家中医药管理局资金项目(国中医药科 0405JP18)

4.2), 正常对照组仅腹腔注射等体积缓冲液。注射 STZ 72h 后,尾静脉采血测空腹血糖并同时测尿糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L、尿糖(+++)以上为造模成功。将造模成功的 45 只雄性大鼠,按体重、空腹血糖随机分为 DM 模型组、解毒通络保肾胶囊中药实验组、苯那普利阳性对照组,每组 15 只。

1.3 给药方法及标本采集 造模 7d 后,中药实验组按 5g/kg 体重给解毒通络保肾胶囊,阳性对照组按 15mg/kg 体重给苯那普利,均配成混悬液灌胃,正常对照组和 DM 模型组则灌服等体积饮用水,连续给药 12 周,每日上午一次。动物单笼饲养,自由进食饮水。12 周末以代谢笼内收集 24h 尿液并离心(2 000rpm)10min,留标本待测尿蛋白和尿肌酐,称体重。将大鼠乙醚麻醉下眶后静脉采血,2 000rpm 离心 10min 后分离血清,留取标本。打开腹腔,快速切除肾脏,在腹主动脉插管后予 4℃预冷的生理盐水反复灌洗,滤纸吸干,去掉包膜,称重。取一部分肾皮质切成小块,立即置入 2.5%戊二醛 0.1M 二甲砷酸钠缓冲液(pH7.4)固定后制备电镜标本,部分肾脏立即置入 10%中性福尔马林液固定,用于光学显微镜标本和免疫组化标本的制备;剩余部分液氮冷冻,-74℃冰箱里冻存。

1.4 测定方法

1.4.1 一般项目 血糖:葡萄糖氧化酶法;血脂、血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、尿肌酐:日立 7150 型全自动生化分析仪测定,并计算内生肌酐清除率(CCr);尿微量白蛋白定量:ELISA 法测定,并计算尿白蛋白排泄率(UAER)。

1.4.2 肾组织 Ang II 定量 放免法测定,具体操作严格按说明书进行,并采用 GAMMA-C12 γ 放射免疫测定仪测定含量,最终结果以 pg/mg 肾皮质蛋白表示,检测结果用组织液中蛋白含量进行校正。

1.4.3 免疫组化检测 将 10%中性福尔马林液固定的肾皮质标本石蜡包埋,切片厚 4 μ m,采用 SABC 法,分别检测 FN 和 Col IV、PCNA、NF-kB、MCP-1、ED-1 蛋白表达。根据肾小球系膜及血管丛染色区变化和染色强度分为 0~4 分,即 0 分为无染色或染色极弱;1 分为局部弱染,染色区 <25%;2 分为局部染色趋强,染色区 25%~49%;3 分为血管丛及系膜区染色增强,染色区 50%~75%;4 分为血管丛及系膜区强染 >75%。由两位观察者对每个样本的肾组织免疫组化切片进行双盲法评分,每个样本观察 40 个肾小球,然后取两者的平均值进行半定量分析。

1.4.4 MCP-1 mRNA 检测 分别取各组大鼠的肾

脏皮质 100 mg,按 Trizol 试剂说明书操作提取总 RNA。MCP-1 引物序列:上游 5'-CACCTGCTGCTACTCATTCACCT-3',下游 5'-GTTCTCTGTCATACTGGTCACTTC-3';GAPDH 引物序列:上游 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3',下游 5'-AGATCACAAACGGATACATT-3'。引物由北京鼎国生物技术发展公司合成。按逆转录试剂盒操作程序进行逆转录。可扩增出长度为 349bp 的 MCP-1 cDNA 片段、长度为 308 bp 的 GAPDH cDNA 片段。PCR 反应体系中包括 cDNA 2.0 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,10mmol/L dNTP 0.5 μ L,MCP-1 引物 3' 1.0 μ L,MCP-1 引物 5' 1.0 μ L,5U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,加灭菌水至总体积为 25.0 μ L。于 95℃预变性 2min 后进入如下循环:95℃ $\rightarrow$ 30s,55℃ $\rightarrow$ 45 s,72℃ $\rightarrow$ 45s,循环数为 30 个,最后于 72℃延伸 10min。1.5%琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)置于电泳槽内,每孔上样 2.5 μ L,同时上样 DL-2000 标准品(与 1.0 μ L 上样缓冲液混匀),3V/cm 电泳 20~30min,紫外灯下拍照,用凝胶图像处理系统对每一样品 PCR 产物扩增的特异性片断 MCP-1 和 GAPDH 进行辉度扫描,并以 GAPDH 密度作为参考定量标准,数值以两者之吸光度(Int) $\times$ 面积(Pix)比值表示,以对照组的比值作为标准 1.0,计算 MCP-1 基因相对表达量。为保证 RT-PCR 结果的特异性和稳定性,采用经 RNA 酶消化的总 RNA 和灭菌双蒸水做阴性对照,每份标本均作双样。

1.5 统计学处理 所有数据均以 ($\bar{X} \pm S$) 表示,采用 SPSS11.0 软件进行方差分析及秩和检验。

2 结果

2.1 一般状态 包括体重、体重 / 肾重、空腹血糖、血脂等。DM 模型组大鼠均出现多饮、多食、消瘦等症状,部分出现烂尾、肢体感染溃烂、白内障等合并症,实验过程中 5 只因衰竭或出现合并症而死亡。中药实验组和阳性对照组相对较轻,分别死亡 3 只和 4 只。与正常对照组比较,DM 模型组大鼠体重显著下降,肾重 / 体重和血糖明显增高($P < 0.01$);中药实验组和阳性对照组体重、肾重 / 体重与 DM 模型组比较,上述指标明显改善($P < 0.01$),中药实验组血糖较 DM 组和阳性对照组下降明显($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 12 周末体重、肾重 / 体重、空腹血糖比较结果 ($\bar{X} \pm S$)				
项目	正常对照组	DM 模型组	中药实验组	阳性对照组
体重(g)	334 $\pm$ 42	204 $\pm$ 28*	252 $\pm$ 54**	234 $\pm$ 43**
肾重 / 体重(%)	3.40 $\pm$ 0.99	7.02 $\pm$ 1.24*	5.08 $\pm$ 1.08**	5.61 $\pm$ 0.81**
空腹血糖(mmol/L)	6.56 $\pm$ 1.16	22.79 $\pm$ 4.90*	12.68 $\pm$ 3.34** Δ	17.47 $\pm$ 7.41**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 DM 模型组比较,* $P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

12 周末 DM 模型组血清总胆固醇(TC)、甘油

三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)均明显高于正常对照组($P<0.01$), 高密脂蛋白(HDL-C)明显低于正常对照组($P<0.01$); 中药实验组较 DM 模型组各项指标均有改善($P<0.05$), 但与正常对照组比较仍有差异($P<0.05$), 与阳性对照组比较除 HDL-C 外均有一定的差异($P<0.05$); 阳性对照组的血脂 4 项与 DM 模型组比较无统计学意义($P>0.05$), 与正常对照组比较有一定的差异($P<0.05$)。表明解毒通络保肾胶囊具有一定的降低 TC、TG、LDL-C 及提高 HDL-C 而调节脂代谢的作用, 苯那普利未发现此作用。见表 2。

表 2 各组大鼠 12 周末血脂比较结果 ($\bar{X}\pm S$) mmol/L				
项目	正常对照组	DM 模型组	中药实验组	阳性对照组
TC	0.93± 0.11	2.54± 0.56**	1.82± 0.58**△	2.29± 0.35*
TG	0.92± 0.25	1.49± 0.43**	1.03± 0.31**△	1.33± 0.50*
LDL-C	0.78± 0.09	1.78± 0.45**	1.36± 0.18**△	1.70± 0.25*
HDL-C	1.20± 0.18	0.75± 0.16**	1.11± 0.23*	1.02± 0.24*

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 DM 模型组比较, * $P<0.05$; 与阳性对照组比较, △ $P<0.05$ 。

2.2 BUN、SCr、CCr、UAER 与正常对照组相比, DM 模型组大鼠 12 周末 BUN、SCr、CCr、UAER 均有不同程度的升高($P<0.01$); 中药实验组和阳性对照组 BUN、SCr、CCr、UAER 较 DM 模型组显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), 在降 BUN、SCr、CCr 方面两组之间比较无统计学意义($P>0.05$), 在降 UAER 方面, 中药实验组优于阳性对照组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组实验大鼠 12 周末 BUN、SCr、CCr、UAER 结果比较 ($\bar{X}\pm S$)				
项目	正常对照组	DM 模型组	中药实验组	阳性对照组
BUN(mmol/L)	7.68± 0.88	21.08± 6.02*	10.73± 5.45***	12.96± 4.24***
SCr(μmol/L)	50.65± 11.44	93.60± 18.22*	69.99± 14.77***	70.77± 12.65***
CCr(mL/min)	5.59± 0.70	10.44± 1.15*	8.69± 1.37**	8.47± 1.56**
UAER(mg/24h)	0.15± 0.05	1.63± 0.34*	0.41± 0.10***△	0.83± 0.12***

注: 与正常对照组比较, * $P<0.01$; 与 DM 模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与阳性对照组比较, △ $P<0.05$ 。

2.3 肾组织病理形态学改变 光镜下可见 DM 模型组大鼠肾小球系膜区弥漫性增宽, 且 PAS 阳性的均质蛋白性物质明显增多, 肾小球 ECM 增多, MC 轻度增生, GBM 增厚, 肾间质中炎性细胞浸润, 部分毛细血管受压而塌陷。中药实验组和阳性对照组的肾小球结构也有类似的病理改变, 但明显较 DM 模型组减轻, 肾小球 ECM 增多及 MC 增生较 DM 组明显减轻, 系膜区 PAS 阳性物质明显减少, 绝大部分毛细血管腔处于开放状态。电镜下可见 DM 模型组实验大鼠的 GBM 呈阶段性增厚, 有的模糊不清, 上皮足突数量减少、广泛融合或部分融合, 滤过膜间隙增大, 系膜区扩大, MC 增多, 部分系膜区 MC 可达 3~4 个。中药实验组和阳性对照组系膜区扩大不明显, GBM 无明显增厚且厚度均匀, MC 增多不显著, 上皮细胞足突均匀分布。

2.4 肾组织中 PCNA、Col IV、FN 表达水平 实验 12 周末, DM 模型组 PCNA 的阳性细胞核免疫染

色从强度到面积都明显增加, 半定量分析结果达正常对照组的 8 倍以上, 具有显著性统计学意义($P<0.01$); 中药实验组和阳性对照组肾小球内 PCNA 染色阳性细胞数明显低于 DM 模型组($P<0.01$), 半定量分析结果表明, 两组的 PCNA 蛋白表达介于正常对照组与 DM 模型组之间。DM 模型组 Col IV 与 FN 染色从强度到面积都明显增加, 半定量分析结果达正常对照组的 5 倍以上, 有显著性统计学意义($P<0.01$), 且其染色浓重的区域通常与细胞增生区域有关; 中药实验组和阳性对照组 Col IV 及 FN 在肾小球内表达从染色强度到面积均明显减轻, 半定量分析结果表明, 两组的 Col IV 和 FN 蛋白表达介于正常对照组与 DM 模型组之间, 与 DM 模型组比较, 均有显著性统计学意义($P<0.01$)。见表 4。

表 4 各组大鼠 12 周末肾组织 PCNA、Col IV、FN 蛋白半定量结果比较 ($\bar{X}\pm S$)				
项目	正常对照组	DM 模型组	中药实验组	阳性对照组
PCNA 蛋白	2.36± 0.57	21.43± 6.65*	13.56± 2.69**	14.28± 3.75**
Col IV 蛋白	10.36± 4.58	73.42± 19.58*	29.56± 7.82**	32.69± 11.48**
FN 蛋白	12.37± 5.97	68.84± 16.02*	27.53± 9.16**	28.54± 10.32**

注: 与正常对照组比较, * $P<0.01$; 与 DM 模型组比较, * $P<0.01$ 。

2.5 肾组织 AngII 含量及 NF-κB、MCP-1、ED-1 蛋白表达水平 实验 12 周末, DM 模型组肾组织中 AngII 含量明显增加, 与正常对照组比较有显著的差异($P<0.01$); 中药实验组和阳性对照组的肾组织中 AngII 含量降低, 与 DM 模型组比较有显著性统计学意义($P<0.01$), 而阳性对照组与正常对照组比较无统计学意义, 阳性对照组与中药实验组之间有显著性统计学意义($P<0.05$)。正常对照组大鼠仅见极少的肾小球 MC 核中表达 NF-κB, 免疫染色较弱, 其 p65 亚单位主要位于细胞浆中; DM 模型组大鼠 NF-κB 蛋白在肾小球细胞核中呈高水平表达, 免疫染色从强度到面积都明显增加, 半定量分析结果可达正常对照组的 8 倍以上, 具有显著性统计学意义($P<0.01$); 中药实验组和阳性对照组大鼠肾小球中 NF-κB 阳性细胞数显著低于 DM 模型组 ($P<0.01$), 半定量分析表明, 两组的 NF-κB 蛋白表达介于正常对照组与 DM 模型组之间, 两组之间比较无统计学意义, 但均明显高于正常对照组($P<0.01$)。正常对照组 MCP-1 及 ED-1 免疫染色极弱, 肾小球内仅有个别单核巨噬细胞浸润; DM 模型组 MCP-1 与 ED-1 染色从强度到面积都明显增加, 单核巨噬细胞浸润肾小球亦明显增多, 半定量分析结果可达正常对照组的 7 倍以上, 具有显著性统计学意义($P<0.01$); 中药实验组和阳性对照组 MCP-1 及 ED-1 在肾小球内表达从染色强度到面积均明显减轻, 半定量分析结果表明, 中药实验组和阳性对照组的 MCP-1 和 ED-1 蛋白表达介于正常对照组与 DM 模

型组之间,肾小球单核巨噬细胞浸润明显降低,与 DM 模型组比较均具有显著性统计学意义 ($P < 0.01$),但两组之间比较无统计学意义。见表 5。

表 5 各组大鼠 12 周末肾组织 AngII 含量及 NF-κB、MCP-1、ED-1 蛋白 ($\bar{X} \pm S$)

项目	正常对照组	DM 模型组	中药实验组	阳性对照组
AngII (pg/mg 肾组织)	6.85±1.80	10.84±1.38*	8.65±0.73**	7.12±0.78 [△]
NF-κB p65 蛋白	2.10±0.38	18.12±4.15*	10.27±3.80**	8.34±2.36**
MCP-1 蛋白	2.62±0.27	17.25±4.63*	10.36±2.24**	8.91±1.37**
ED-1 蛋白	2.05±0.34	14.31±3.45*	6.26±1.82**	7.84±1.96**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 DM 模型组比较,* $P < 0.01$;与中药实验组比较,** $P < 0.05$ 。

2.6 肾组织 MCP-1 mRNA 表达 实验 12 周末,各 DM 组大鼠肾皮质 MCP-1 mRNA 表达较正常对照组有不同程度的增加,均有显著性统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$),其中 DM 模型组大鼠肾皮质 MCP-1 mRNA 表达水平为正常对照组的 2.56 倍。中药实验组和阳性对照组肾皮质 MCP-1 mRNA 表达水平较 DM 模型组均明显降低 ($P < 0.05$),分别为 DM 模型组的 53.26%、57.61%,为正常对照组的 1.36 倍和 1.47 倍,两组之间比较无统计学意义。见表 6。

表 6 各组实验大鼠 12 周末肾组织 MCP-1 mRNA 表达比较 ($\bar{X} \pm S$)

项目	正常对照组	DM 模型组	中药实验组	阳性对照组
MCP-1 mRNA	0.36±0.14	0.92±0.15*	0.49±0.22***	0.53±0.24***

注:表中所列的数据为 MCP-1 mRNA 与 GAPDH 二者吸光度和面积乘积的比值;与正常对照组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与 DM 模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

DN 病因及发病机制十分复杂。本实验室以往研究结果显示 DM 大鼠肾脏局部 AngII 水平增加,解毒通络保肾胶囊可通过抑制 DM 时肾脏局部活跃的 RAS,减少肾组织中的 AngII 含量,进而抑制 TGF-β1 活性,间接下调 CTGF mRNA 表达,进而减轻 DM 性肾脏损害,对肾脏产生保护作用^[3,4]。AngII 不仅是一种血管活性因子,影响肾脏血流动力学,还作为一种生长因子及促纤维化因子,直接影响肾脏固有细胞的生物学功能,并与高糖具有协同效应;AngII 作为一种炎症因子,可促进单核巨噬细胞聚集,发生炎症反应;还可通过与靶细胞表面的特异性受体结合,使靶细胞核内转录因子的活性改变,同时 NF-κB 活化后可通过自分泌方式进一步促进 AngII 的生成。NF-κB 是一种与炎症介质的产生、细胞增生、ECM 交联和细胞凋亡有关的转录因子,参与了多种炎症反应的信号传导过程^[5]。NF-κB 的异常激活将启动不正常的炎症反应和自身免疫反应。用逆转录病毒将 NF-κB 的抑制蛋白基因导入高糖培养的 MC 中,可抑制 MC 中 MCP-1 mRNA 表达的增加,而使用 PKC 或活性氧簇 (ROS) 抑制剂不仅可以有效抑制 NF-κB 的活性,还可抑制 MCP-1 蛋白的产生^[6],说明活化的 NF-κB 可以上调 MCP-1 mRNA 及其蛋白表达,从而在 DM 的肾损害中发挥重要作用。MCP-1 属于趋化性细胞因子 C-C 亚家族

的一个成员,是发动炎症反应,促进肾小球 MC 增生、PCNA 表达增加和 ECM 沉积的重要因子,具有介导单核细胞产生细胞因子、表达黏附分子等多种生物效应。MCP-1 基因启动子部位存在 NF-κB 的结合位点。AngII 通过激活 NF-κB 促进 MCP-1 的合成,参与肾脏组织中单核细胞的募集反应,介导肾脏组织的炎症反应,是影响慢性肾脏病预后重要环节。

本实验研究结果显示,经解毒通络保肾胶囊治疗 12 周后的 DM 大鼠,血糖、血脂、BUN、SCr、UAER、CCr、肾重/体重比及肾脏病理形态学改变等有较明显改善,能明显抑制肾小球系膜区 ECM 主要成分,并且能明显抑制实验性 DM 大鼠肾小球 PCNA 高表达,减少 MC 增殖。DM 模型组肾组织 MCP-1 表达较正常组明显增加 ($P < 0.01$),并与蛋白尿水平呈正相关,与 Mezzano^[7]的报道一致。DM 模型组实验大鼠肾皮质 MCP-1 mRNA 的表达明显增加,为正常对照组的 2.56 倍,与国外文献报道相符^[8],并与肾组织中 AngII 含量、MCP-1、NF-κB、ED-1、PCNA 蛋白表达增加、ECM 主要成分 Col IV 和 FN 蛋白表达程度及肾脏病理变化呈正相关。经解毒通络保肾胶囊治疗 12 周后的实验组大鼠肾皮质 MCP-1 mRNA 水平均显著低于 DM 模型组 ($P < 0.05$),但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$)。表明解毒通络保肾胶囊对 DM 大鼠肾小球 MCP-1 蛋白及基因表达具有显著的下调作用,能改善 DM 大鼠肾脏损害,延缓 DN 进展,对 DM 所致肾脏损害有良好的保护作用。

解毒通络保肾胶囊下调 DM 大鼠肾脏 MCP-1 蛋白及基因表达的作用机制有以下几种可能:(1)通过抑制 DM 时肾脏局部 AngII 含量,至少部分阻断激活的 NF-κB 调控的 MCP-1 蛋白表达增加,间接下调 MCP-1 mRNA 表达,减少肾组织中单核巨噬细胞浸润,下调肾小球 ECM 表达,从而减轻肾组织结构与功能的损害。或通过抑制肾脏局部的 RAS,减少 AngII 含量,直接抑制 MCP-1 表达。(2)通过降低血糖,改善糖代谢,抑制非酶糖基化,阻断 AGEs 与受体结合及高糖 PKC 途径激活的 NF-κB,抑制 MCP-1 表达。(3)通过调节脂代谢紊乱,直接抑制 MCP-1 基因表达。(4)通过抑制 TGF-β1 的表达^[3],减少 MCP-1 表达。实验显示^[9],MCP-1 可通过 TGF-β 介导胶原在肾小球的沉积,TGF-β 可促进肾小管分泌 MCP-1,MCP-1 伴随 TGF-β 的上调是介导 DN 间质性损害的可能途径之一。目前在体内条件下,由于有许多干扰因素的存在,尚很难判断哪种机制在解毒通络保肾胶囊抑制 MCP-1 表达中起

作用,有待体外实验研究中进一步确定。

本实验表明 AngII、NF-κB 和 MCP-1 在 DN 的发生、发展中起着极其重要的作用。三者在 DN 发病机制中的作用可能是 AngII 刺激 NF-κB 表达增强,进而诱导 MCP-1 的表达增加,MCP-1 又刺激单核巨噬细胞,并使 PCNA 表达增加,MC 增生,ECM 积聚,加重 DN。解毒通络保肾胶囊能通过减少肾组织中 AngII 含量,阻断 NF-κB 过度表达,进而干预 DM 大鼠肾组织 MCP-1 表达途径,抑制 DN 肾内炎症。因此,解毒通络保肾胶囊有可能通过抑制 DN 炎症机制,减少肾小球单核巨噬细胞浸润、MC 过度增殖及 ECM 积聚,在延缓 DN 的进展和降低 USRD 的发病率方面起重要作用,但详细的调控机制尚需进一步研究。

参考文献

[1]李秀钧,郭云红.糖尿病是一种炎症性疾病[J].中华内分泌代谢杂志,2003,19 (4): 251-253
[2]Ruiz-Ortega M,Bustos C,Hernadez-Presa MA,et al.Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune

complex nephritis through nuclear factor-kappaB activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis [J].J Immunol, 1998, 161 (1):430-439
[3]赵贤俊,李才,邓悦,等.解毒通络保肾胶囊对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J].中国中医基础医学杂志,2003,9 (8): 586-591
[4]房辉,徐刚,于德民,等.TGF-β1 和 ECM 与糖尿病肾病的关系的实验研究[J].中国糖尿病杂志,2000,8 (4): 227-230
[5]Morrissey J,Klahr S.Transcription factor NF-κ B regulation of renal fibrosis during ureteral obstruction [J].Semin Nephrol,1998,18 (6): 603-611
[6]Ha H,Yu MR,Choi YJ,et al.Role of high glucoseinduced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells[J].J Am Soc Nephrol,2002,13:894-902
[7]Mezzano SA, Progett MA, Burgos ME, et al.Overexpression of chemokines fibrogenic cytokines and myofibroblasts in human membranous[J].Kidney Int, 2000, 57(1):147-158
[8]Sassy Prigent C, Heudes D, Mandet C,et al.Early glomerular macrophage recruitment instreptozotocininduced diabetic rats [J]. Diabetes,2000, 49(3):466-475
[9]Schneider A,Panzer U, Zahner G,et al.Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factorβ [J].Kidney Int, 2000,56:135-141

(收稿日期: 2009-02-16)

腹水超滤浓缩回输治疗顽固性腹水的临床研究

汤雄

(江西省九江市第三人民医院 九江 332000)

关键词:肝硬化;顽固性腹水;超滤浓缩回输

中图分类号:R 256.51

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2009)03-0005-01

腹水是内科常见症状之一,从根本上消除导致腹水的病因,临床尚有一定困难,大量腹水的存在加重了病情的发展,且给病人造成极大痛苦。我院自 2001 年 5 月以来对顽固性腹水的治疗进行了研究,采用腹水超滤浓缩腹腔内回输方法,对 33 例患者进行了治疗,临床疗效好。现报告如下:

1 资料与方法

1.1 治疗对象 33 例顽固性腹水患者,住院 29 例,门诊 4 例;男 30 例,女 3 例;年龄 30~59 岁,平均 48.6 岁;腹水持续时间 2~48 个月。腹围 82~127cm,平均 98.6cm。

1.2 材料 WLFHY-500 型伟力电脑腹水超滤浓缩回输系统。

1.3 方法 按腹水穿刺常规操作,将腹水自左下腹引入动脉导管内,以正压泵控制腹水流速为 150~250mL/s,腹水通过过滤器时在负压泵作用下使水及中、小分子等物质滤出,浓缩后的腹水经静脉导管自患者右上腹回输入腹腔。全过程为密闭式无菌操作,1 次治疗时间 1.5~3h,两周左右治疗 1 次,少数治疗 1~2 次即可见到明显效果。

1.4 疗效判定标准 显效:腹胀明显减轻,体重下降,腹围缩小,呼吸困难缓解,尿量增加 500mL/d 以上,食欲增加,下肢浮肿消失,病情得到改善,腹水消失或余少量,维持 3 个月左右者。有效:腹胀减轻,尿量增加,食欲改善,腹水 1 个月后又逐渐增多者。无效:腹胀减轻,食欲增加,尿量增多得到短期缓解,半个月左右腹水恢复到原有水平者。

2 结果

2.1 电解质、蛋白含量变化 见表 1、表 2。腹水超滤浓缩后钾、钠、氯、尿素氮基本无变化,总蛋白及胆红素浓缩 3~5 倍。

表 1 33 例治疗前后血清电解质、蛋白含量平均值					
	钾(mmol/L)	钠(mmol/L)	氯(mmol/L)	白蛋白(g/L)	总蛋白(g/L)
超滤前	3.84	133.16	97.34	23.19	61.27
超滤后	3.73	136.21	96.27	25.13	63.14

表 2 33 例治疗前后腹水电解质、蛋白、尿素氮、胆红素含量平均值						
	钾(mmol/L)	钠(mmol/L)	氯(mmol/L)	尿素氮(mmol/L)	总蛋白(g/L)	胆红素(μmol/L)
超滤前	3.79	134.38	98.13	27.48	4.28	42.82
超滤后	3.72	137.10	97.26	25.82	20.12	132.71

2.2 副作用 疗后极少数患者出现一过性腹痛,服解痉药症状缓解。

2.3 临床疗效 由于直接滤出大量水分,避免了大量利尿所致电解质紊乱等副作用,明显改善症状,缓解了病情,总有效率达 78.79%。(下转第 7 页)